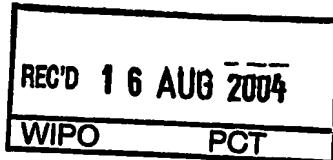


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

28. 07. 2004

EP04/7581



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

BEST AVAILABLE COPY

Aktenzeichen: 103 33 901.9

Anmeldetag: 21. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: TransTissue Technologies GmbH, 10117 Berlin/DE

Erstanmelder: Dr. Christian Kaps, 10965 Berlin/DE;
Dipl.-Ing. Jochen Ringe, 13507 Berlin/DE.

Bezeichnung: Arthrose

IPC: A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Kahle

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Genproduktes oder mehrerer Genprodukte der Tabelle 4 zur Rekrutierung ortständiger mesenchymaler Vorläuferzellen.
- 5 2. Verwendung eines Genproduktes oder mehrerer Genprodukte nach Anspruch 1, wobei die mesenchymalen Vorläuferzellen mesenchymale Stammzellen sind.
- 10 3. Verwendung eines Genproduktes oder mehrerer Genprodukte nach Anspruch 1-2, wobei die mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark rekrutiert werden.
4. Verwendung eines Genproduktes oder mehrerer Genprodukte nach Anspruch 1, wobei die Genprodukte in Form von RNA, DNA, cDNA, Peptiden oder Proteinen zur Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen dienen.
- 15 5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Genprodukte mit biologisch abbaubaren Polymeren gemischt sind.
6. Verwendung nach Anspruch 1 und 5, wobei die Genprodukte mit Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren gemischt sind.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren Chondrogenese induzieren.
- 20 8. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren Osteogenese induzieren.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet des Tissue-Engineering,
35 insbesondere den Ersatz von krankhaften Geweben in den Gelenken (vorwiegend Knochen und Knorpel) und die Behandlung von osteoarthrotischen Krankheitsbildern in Gelenken. Zu diesem Zweck wird die Verwendung von Chemokinen zum Rekrutieren von mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zum Defektort offenbart. Das durch die Chemokine hervorgerufene
40 Einwandern der mesenchymalen Vorläuferzellen in den Defekt wird gefolgt von der Regeneration krankhaften Gewebes (vorwiegend Knochen und Knorpel). Die Erfindung betrifft die Verwendung von chemotaktischen, eine Zelle zur Bewegung in Richtung des Reizes lockenden Faktoren, den Chemokinen, zum Aktivieren und Rekrutieren ortständiger mesenchymaler Vorläuferzellen. Dabei
45 bezieht sich die Aktivierung der mesenchymalen Vorläuferzellen auf die Rekrutierung von ortständigen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zur in situ Geweberegeneration von Knorpel und Knochen.

Beschreibung:

50 Arthrose

Die Osteoarthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit. Im Verlauf dieser primär degenerativen Gelenkerkrankung kommt es zu einer schrittweisen lokalen Zerstörung der Gelenkoberfläche, der Degeneration des artikulären Knorpels. Die Folge sind Schmerzen und eine eingeschränkte Funktion und Beweglichkeit. Die 55 Faktoren, welche die Entstehung einer Osteoarthrose beeinflussen, sind unter anderem das Alter, das Geschlecht, das Gewicht, Osteoporose, mechanische Überbeanspruchung, Fehlstellungen und Traumen.

Konventionelle orthopädische Therapieverfahren, wie „Debridement“, „Gelenkshaving“, „Microfracture“ und „Drilling“, sind oftmals nur unzureichend 60 wirksam. Als letzte Konsequenz bleibt häufig nur ein rekonstruktiver Eingriff mit endoprothetischem Gelenkersatz [Buckwalter JA and Mankin HJ (1998) „Articular Cartilage Repair and Transplantation.“ *Arthritis & Rheumatism* 41:1131-1342]. Alternative Verfahren zur Wiederherstellung von Gelenkknorpel oder auch von Knochen nutzen die Techniken des Tissue Engineering, der 65 künstlichen Gewebezüchtung. Hierzu werden dem Patienten autologe Knorpelzellen oder mesenchymale Vorläufer- oder Stammzellen entnommen und in aufwendigen Zellkulturverfahren vermehrt. In einer zweiten Operation werden diese Zellen in den mit einem Periostlappen abgedeckten Defektbereich injiziert (ACT, Autologe Chondrozyten Transplantation) [Brittberg M et al. (1994) „Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte 70 transplantation.“ *New England Journal of Medicine* 331:889-895] oder nach Verpackung in die Knorpel- (Chondrogenese) oder auch Knochenreifung (Osteogenese) fördernde dreidimensionale Biomaterialien in den Defekt eingebettet [US 5891455: Process for producing an implant from cell culture]. Neuere Methoden hingegen zielen auf die Regeneration von Defekten direkt im Gewebe, die *in situ* Regeneration, ab. Hierzu werden Biomaterialien in den Defekt eingebettet, welche mit biologisch aktiven Faktoren, wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, extrazellulären Matrixmolekülen und chemotaktischen Faktoren, versehen sind, um mesenchymale Zellen an den 75

80 Defektort zu dirigieren und dort zur Regeneration des defekten Gewebes anzuregen. Als chemotaktische Faktoren werden hier erfindungsgemäß Proteine, die die Eigenschaft besitzen humane Zellen bei der Migration zu unterstützen oder diese zur Migration anzuregen, verstanden. Hierbei handelt es sich erfindungsgemäß um extrazelluläre Matrixmoleküle und sezernierte Proteine, die

85 im Gewebe diffundieren. Chemotaktische Faktoren umfassen erfindungsgemäß eine Familie von Proteinen, die sich aus Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (beispielsweise Transforming Growth Factor (TGF) Familie, Bone Morphogenetic Protein (BMP) Familie, Cartilage Derived Morphogenetic Proteins (CDMP), Fibroblast Growth Factor (FGF) Familie,

90 Connective Tissue Growth Factor (CTGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Familie, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Familie, Epidermal Growth Factor (EGF) Familie), extrazellulären Matrixmolekülen (beispielsweise Osteopontin, Fibronectin, Hyaluronsäure, Heparin, Thrombospondin, Collagene, Vitronectin) und Chemokine (CCL, CCRL, CX₃CL und XCL) zusammensetzen.

95 Die Verwendung von Matrixmolekülen (Osteopontin) und Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (cartilage derived morphogenetic protein) als chemotaktische Faktoren, die mesenchymale Zellen nicht nur zur Einwanderung in den Defekt, sondern gleichzeitig auch zum gewebespezifischen Reifen induzieren, ist im Gegensatz zu der Proteinfamilie der Chemokine beschrieben [DE 19957388A: Chondroinduktive und implantierbare Substrate zur Knorpelheilung und -protektion]. In der hier vorliegenden Patentschrift wird die distinkte Proteinfamilie der Chemokine erfindungsgemäß zur Rekrutierung von mesenchymalen Vorläufer- und Stammzellen aus dem Knochenmark verwendet.

100 Hierbei werden diese mesenchymalen Zellen gemäß eines sich aufgrund der Diffusion aufbauenden Konzentrationsgradienten an den gewünschten Ort gelenkt, wobei dieser Reiz durch Bindung der Chemokine an spezifische Chemokinrezeptoren vermittelt wird. Die Expression bzw. das Vorhandensein dieser zu aktivierenden Rezeptoren in humanen oder tierischen mesenchymalen Vorläufer- und Stammzellen ist in der wissenschaftlichen Literatur bisher nicht beschrieben und wird in dieser Patentschrift im Abschnitt „Material & Methoden“

105

110

dargestellt. Aufgrund der Expression dieser Rezeptoren ist davon auszugehen, daß mesenchymale Vorläufer- und Stammzellen auf Chemokine reagieren und aufgrund des Chemokinsignals wandern können. Die differierenden
115 Expressionshöhen legen Nahe, daß hierbei die Liganden der am höchsten exprimierten Rezeptoren diejenigen Chemokine sind, auf welche die mesenchymalen Vorläufer- und Stammzellen am Stärksten ansprechen und wandern. Mit abnehmendem Expressionsniveau sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß die Zellen auf die dem Chemokinrezeptor korrespondierenden Chemokine
120 chemotaktisch reagieren und wandern. Die Wanderungseigenschaften der Stammzellen und das „Anlock“-Potential von Chemokinen soll hier in dieser Erfindung genutzt werden, um *in situ* ortständige Vorläufer- und Stammzellen zu einem bestimmten Defektor zu rekrutieren. Hierbei werden die Chemokine aus der Gruppe 1-41, vorzugsweise aus der Gruppe 1-18, besonders bevorzugt aus der
125 Gruppe 1-8 ausgewählt (Tabelle 4) und in Form von DNA, cDNA, RNA, Peptiden und vorzugsweise als Protein in den Knochen- oder Knorpeldefekt eingebracht, wobei eine Verbindung zum Knochenmarkraum geschaffen ist. Nach Einwanderung der mesenchymalen Zellen in den Knochen- oder Knorpeldefekt bauen diese Zellen im Defekt ein den Defekt ausfüllendes und stabilisierendes
130 Regeneratgewebe auf. Durch Zumischen von die Osteogenese oder Chondrogenese fördernden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren kann der Aufbau des knöchernen oder knorpeligen Regeneratgewebes unterstützt werden.

Chemokine

135 Chemokine sind Proteine (5-20 kDa), die eine wichtige physiologische Rolle bei einer Vielzahl von Prozessen wie der Hämatopoiese von Blutstammzellen und der Chemotaxis von Leukozyten spielen [Whetton AD., Graham GJ. (1999) „Homing and mobilization in the stem cell niche.“ Trends Cell Biol. 9:233-238]. Unter Chemotaxis wird die durch einen chemischen Reiz ausgelöste positive oder
140 negative, in Richtung auf den Reiz hin bzw. von ihm fort erfolgende Bewegungsreaktion beweglicher Organismen oder Zellen, deren Zellmembran durch entsprechende „chemotaktische Stoffe“ (Chemokine, Chemotaxine) aktiviert wird, verstanden. Diese Aktivierung wird durch die dem Chemokin

korrespondierenden Zelloberflächenrezeptor (Chemokinrezeptor) vermittelt.

145 Die Aminosäuresequenzen aller Chemokine sind ähnlich und charakterisiert durch
eine unveränderliche Anordnung von vier Cysteinen. Je nach Lage der ersten zwei
Cysteine wird die Chemokinfamilie in vier Subfamilien unterteilt: CC-, CXC-,
CX₃C- und C-Chemokine, wobei die Vertreter der C-Subfamilie nur zwei
Cysteine aufweisen (Tabelle 1) [Murphy et al. (2000) „International union of
150 pharmacology. XXII. Nomenclature of chemokine receptors.“ Pharmacol Rev 52
:145-176]. Die Chemokine selbst werden als CCL, CXCL, CX₃CL und XCL
bezeichnet. Dabei steht "L" für Ligand. Neben den Nomenklaturnamen werden
häufig auch die Trivialnamen benutzt. Chemokine und ihre Rezeptoren werden
von einer großen Zahl hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer Zellen
155 exprimiert. Die Chemokinaktivität wird durch die Bindung an einen spezifischen
G-Protein gekoppelten Rezeptor initiiert. Obwohl die meisten Untersuchungen
bezüglich der Wirkungsweise von Chemokinen bisher an Leukozyten
durchgeführt wurden, erstreckt sich ihre Funktion weit über die
Leukozytenphysiologie [Rossi D. and Zlotnik A. (2000) „The biology of
160 chemokine and their receptors.“ Annu Rev Immunol. 18:217-242].

Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind klassifiziert als Rezeptoren für CCL, CXCL, CX₃CL

und XCL und werden systematisch mit CCR, CXCR, CX₃CR und XCR

165 bezeichnet („R“ steht für Rezeptor) (Tabelle 1). Einige von ihnen können mehrere
Chemokine einer Subfamilie binden. Die Aminosäuresequenz der
Chemokinrezeptoren untereinander ist zu 25-80% identisch und zu 25% identisch
mit vielen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren [Murphy et al. (2000) „
International union of pharmacology. XXII. Nomenclature of chemokine
170 receptors.“ Pharmacol Rev 52 :145-176]. Der N-Terminus ist an der
extrazellulären Seite der Membran lokalisiert und meistens glykolyisiert, während
sich der C-Terminus an der zytoplasmatischen Seite befindet und phosphoryliert
ist. Drei extrazelluläre Schleifen wechseln sich mit drei intrazellulären ab und
verbinden sieben hydrophobe transmembrane Domänen. Ein Zweistufenmodell für
175 die Rezeptoraktivierung wurde entwickelt: Die Chemokinbindung an den

Rezeptor führt zuerst zu einer Konformationsänderung des Chemokins und daraufhin folgt die Aktivierung des Rezeptors durch den N-Terminus des Chemokins [Crump MP et al. (1997) „Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor- dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1.“ Embo J. 16: 6996-7007]. Dabei wird an die α -Untereinheit des G-Proteins gebundenes GDP durch GTP ausgetauscht; das G-Protein dissoziiert vom Rezeptor und löst im zytoplasmatischen Raum eine Kaskade biochemischer Reaktionen aus [Mellado M. et al. (2001) „Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation.“ Annu Rev Immunol. 19: 397-421]. CC- und CXC-Rezeptoren wurden bei Monozyten, Lymphozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Chondrozyten nachgewiesen. Zur CC-Chemokinrezeptorfamilie gehören elf CC-Rezeptoren (CCR1-CCR11). Sie weisen sieben charakteristische Sequenzabschnitte auf, die sie von den 6 Rezeptoren der CXCR-Familie (CXCR1-CXCR6) unterscheiden.

Tabelle 1: Humane Chemokinrezeptoren und ihre Liganden

Chemokinrezeptor	Chemokin-Ligand
CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14a, CCL14b, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL24, CCL26
CCR4	CCL3, CCL5, CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1, CCL16
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, CCL28
CCR11	CCL2, CCL8, CCL13, CCL19, CCL21, CCL25
CXCR1	CXCL5, CXCL6, CXCL8
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL7, CXCL8
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
XCR1	XCL1, XCL2
CX3CR1	CX3CL1

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Chemokinen zum Rekrutieren, sprich
195 zum Anlocken, von ortsständigen mesenchymalen Vorläuferzellen zur
Regeneration von krankhaften Gelenkdefekten, vorwiegend bei Arthrose.
Mesenchymale Vorläuferzellen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Zellen,
die die Eigenschaft besitzen, sich in eine oder auch mehrere mesenchymale
Gewebe zu entwickeln. Dieses können im Sinne der Erfindung Vorläuferzellen
200 sein, die sich als Vorläuferzellen von Knorpelzellen in Knorpelzellen entwickeln
oder auch Vorläuferzellen sein, die die Fähigkeit besitzen, sich in Knorpel- und
Knochenzellen zu entwickeln. Dabei werden die mesenchymalen Vorläuferzellen
durch Chemokine aus dem umliegenden gelenksnahen Gewebe, bevorzugt aus
dem Knochenmark, angelockt und zum Defektort dirigiert. Dort verbleiben die
205 mesenchymalen Vorläuferzellen und bilden im Knochendefekt ein knöchernes
und im Knorpeldefekt ein knorpeliges Regeneratgewebe aus.
Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform die Verwendung
von Chemokinen zum Rekrutieren von mesenchymalen Stammzellen.
Mesenchymale Stammzellen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind
210 mesenchymale Vorläuferzellen, die die Fähigkeit besitzen sich in mehrere,
wenigstens in zwei verschiedene mesenchymale Gewebe zu entwickeln.
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende
Erfindung die Verwendung von Chemokinen zum Rekrutieren von
mesenchymalen Vorläufer- oder Stammzellen aus dem Knochenmark. Hierzu
werden im Sinne der Erfindung vorwiegend arthroskopisch kleine Kanäle vom
215 Defektort des Knorpels in das dem Knorpel unterliegende Knochengewebe
gebohrt, so daß eine Verbindung zwischen Defektort und Knochenmark entsteht.
Das Einbringen von Chemokinen in den Defekt sorgt für ein Anlocken von
mesenchymalen Vorläufer- oder Stammzellen, welche sich im Defekt ansiedeln
und dort ein den Defekt verschließendes Regeneratgewebe ausbilden.
Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Chemokinen zur
Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Form von RNA, DNA,
cDNA, Peptiden oder Proteinen. Vorteilhaft ist hier das Einbringen von RNA,
DNA oder cDNA, welche von ortständigen Zellen aufgenommen, abgelesen und
225 als reifes Protein ausgeschüttet werden. Besonders bevorzugt im Sinne der

Erfindung ist hier die Verwendung der Chemokine in Form von Peptiden oder Poteinen zur Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die zur Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen verwendeten Chemokine mit biologisch abbaubaren Polymeren gemischt. Biologisch abbaubare Polymerer im Sinne der Erfindung sind drei-dimensionale Polymerstrukturen, welche auf Zellen keine

230 toxischen Einflüsse ausüben, keine Immunreaktion hervorrufen und den Gewebeaufbau von Knorpel oder Knochen fördern. Das Einbringen von biologisch abbaubaren Polymeren mit Chemokinen in den zu schließenden Defekt 235 führt zum Anlocken von mesenchymlen Vorläuferzellen, welche direkt in das Polymergewebe einwandern und dort eine drei-dimensionale Polymerstruktur zur optimalen Gewebereifung in Knorpel oder Knochen vorfinden.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Chemokinen, die mit biologisch abbaubaren Polymeren und Wachstums- und

240 Differenzierungsfaktoren gemischt sind. Das Einbringen solch eines Gemisches in den Defekt birgt den Vorteil, daß die angelockten mesenchymalen Vorläuferzellen neben der optimalen, die Gewebereifung fördernden Polymerstruktur noch zusätzlich durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu Gewebereifung angeregt werden.

245 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Chemokinen, die mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gemischt sind, die die Knorpelreifung induzieren. Die Knorpelreifung induzierende Faktoren im Sinne der hier vorliegenden Erfindung sind Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die entwicklungsbiologisch eine

250 Vorläuferzelle zur Differenzierung und Reifung in einen chondrozytäre Zelltyp oder eine reife Knorpelzelle zur Produktion von Knorpelmatrix anregen.

Vorteilhaft ist hierbei die Verwendung von Mitgliedern der Familie der cartilage derived morphogenetic proteins (CDMP) und bone morphogenetic porteins (BMP).

255 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Chemokinen, die mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gemischt sind, die die Knochenreifung induzieren. Die

Knochenreifung induzierende Faktoren im Sinne der hier vorliegenden Erfindung sind Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die entwicklungsbiologisch eine Vorläuferzelle zur Differenzierung und Reifung in einen knöchernen Zelltyp oder eine reife Knochenzelle zur Produktion von Knochenmatrix anregen. Vorteilhaft ist hierbei die Verwendung von Mitgliedern der Familie der bone morphogenetic proteins (BMP), besonders bevorzugt die Mitglieder BMP-2 und BMP-7.

260 265 **Material und Methoden:**

Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC) wird nach einem bereits beschriebenen Protokoll zur Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark durchgeführt [Haynesworth SE. et al (1992) „Characterization of cells with

270 osteogenic potential from human marrow.“ Bone 13: 81-88; Pittenger MF et al. „Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.“ Science

284:143-147]: Maximal 3 ml Knochenmarkspunktat werden mit 10 ml PBS

gemischt und für 10 Min. und 310 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das

Zellpellet wird resuspendiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen werden

275 in 20 ml DME-Medium (mit 10-20% FBS, 2% HEPES, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) aufgenommen. Je 5 ml dieser

Zellsuspension wird auf 20 ml eines Percoll Dichtegradienten der Dichte 1,073

g/ml gegeben. Die Zellen werden bei 900 g für 32 Min. zentrifugiert. Die obere

Phase wird in ein neues Zentrifugenrörchen überführt. Nach Zugabe des 2,5-

280 fachen Volumens PBS erfolgt erneut das Zentrifugieren bei 310 g für 6 Minuten.

Das Zellpellet wird in DME-Medium aufgenommen. $1,5 \cdot 10^5$ - $3,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² werden zur Kultur in eine Zellkulturflasche geben und bei 37°C, 5% CO₂

inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 72 Stunden, dann alle 3-4 Tage.

Die so isolierten Zellen wachsen nach 2-3 Wochen konfluent und werden dann

285 mittels Trypsinisieren in einer Zelldichte von 6.000 Zellen/cm² Kulturoberfläche

in ein neues Kulturgefäß überführt (Passage 1). Nach circa einer Woche werden

die Zellen erneut trypsinisiert (Passage 2). Die Homogenität der vorliegenden

Kultur humaner mesenchymaler Stammzellen wird mittels FACS-Analyse

verifiziert, wobei die Oberflächenantigene Endoglin und ALCAM nachzuweisen
290 und die Oberflächenantigene CD34, CD 45 und CD 14 nicht nachzuweisen sind.

Genexpressionsanalyse zum Nachweis der Chemokinrezeptoren

Die isolierten, expandierten und überprüften humanen MSC exprimieren
Chemokinrezeptoren. Dies wurde mittels RT-PCR bei mehreren humanen

295 Patienten (n=3) nachgewiesen:

Für das Isolieren der Gesamt-RNA wird Tri Reagent LS eingesetzt. Die MSC werden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Verwerfen des Zellkulturmediums wird zur Lyse der Zellen der Zellrasen mit 0,4 ml Tri Reagent LS pro 10 cm² Wachstumsfläche überschichtet. Das Lysat wird in ein steriles Reaktionsgefäß

300 überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Lysat wird mit 0,1 ml Brom-Chlor-Propan (BCP) pro 0,75 ml Tri Reagent LS versetzt, für 15 Sekunden geschüttelt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12000 g führt zur Phasentrennung. Die wässrige Phase ist in 200 µl Aliquots abzunehmen und in ein Reaktionsgefäß zu 305 überführen. Die RNA-Lösung wird mit 0,5 ml Isopropanol pro 0,75 ml Tri Reagent LS versetzt und für mindestens 7 Minuten bei -20°C belassen. Die gefällte RNA wird durch Zentrifugation für 8 Minuten bei 4°C und 12000 g pelletiert. Das resultierende RNA-Pellet ist mit 70% EtOH zu waschen, an der Luft zu trocknen und in 20 µl DEPC-H₂O aufzunehmen. Zur Lösung des Pellets 310 wird es für 10 Minuten auf 55°C erhitzt. Der Gehalt an isolierter Gesamt-RNA wird durch eine photometrische Messung bestimmt.

Zur cDNA-Synthese werden 5 µg Gesamt-RNA in 10 µl DEPC-H₂O eingesetzt und mit 1 µl Oligo-(dT)12-18 Primern versetzt, um für 10 Min. bei 70°C denaturiert zu werden. Nach der Denaturierung wird der Reaktionsansatz auf Eis 315 gelagert und mit 4µl 5x Puffer (0,25 M Tris/HCl, pH 8,3; 0,375 M KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP (je 10 mM) und 0,4 µl RNase Inhibitor versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Min. bei 37°C wird der Reaktionsansatz mit 1 µl SuperScript Rerverser Transkriptasé versehen, um für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert zu werden. Nach der Zugabe von 40 µl TE

320 (10/1, pH 7,8) wird das Enzym für 10 Min. bei 92°C inaktiviert. Für die RT-PCR Reaktionen werden 2,0 µl cDNA eingesetzt.

Als Standard werden pro PCR-Reaktion 1 µl cDNA eingesetzt. Zu der cDNA werden in einem PCR-Reaktionsgefäß 2 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 0,2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 5 nM Primer (Tabelle 2) und 0,5 U Taq DNA Polymerase gegeben und mit H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Ein Standardreaktionszyklus geht von einer Denaturierung bei 95°C für 1 Min., einer Hybridisierung der Primer bei einer für die Primer spezifischen Temperatur (T_{an}) für 15 Sek. und einer DNA-Synthesereaktion bei 72°C für 15 Sek. aus. Dieser Zyklus wird insgesamt 35 mal wiederholt. Abschließend lässt man den Ansatz für 3 Min. bei 72°C. Die PCR-Produkte werden mittels Gelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert und in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) kloniert. Nach Amplifizieren im E. coli Stamm JM109 wurde das entsprechende Plasmid isoliert und zum Nachweis, daß mittels der in Abbildung 3 verwendeten Oligonukleotide die korrespondierenden Chemokinrezeptoren amplifiziert wurden, sequenziert und somit bestätigt.

Tabelle 2: Oligonukleotide zum Nachweis der Expression humaner Chemokinrezeptoren

Rezeptor	Identifier	Amplifikatlänge (Basenpaare)	Oligonukleotidsequenz (5' > 3')
ccr1 upper	NM_001295	129	GAGCCAATCAGTAGCCAGCATCT
ccr1 lower	NM_001295		GTTCCCCCATTTCTATTTCCTCGTT
ccr2 upper	NM_000647	173	CTCCCTGAAGTAAGCAAAGAC
ccr2 lower	NM_000647		CCATGTGGCCTGAAAGTAG
ccr3 upper	NM_178329	148	GGCAGATAACATCCCATTCCITC
ccr3 lower	NM_178329		GGTTGCTTCATCTCCTGGTCCTT
ccr4 upper	X85740	91	CAGGGGCCTTTTGTC
ccr4 lower	X85740		CATGGTGGACTGCGTGTAAAGAT
ccr5 upper	NM_000579	160	AGGAGGGAGGTATCGTAAGG
ccr5 lower	NM_000579		TTCAAGGGTTCTCCAATCTG
ccr6 upper	NM_031409	86	TGGTTACAGCACAAAATGATGG
ccr6 lower	NM_031409		TTGCCTAAAATGAGTGTGTTG
ccr7 upper	NM_001838	194	GCCGCCCTAAAAGCACACTCATCC
ccr7 lower	NM_001838		TTCCCTTGTCCCTCTCCCTCCATCC
ccr8 upper	NM_005201	198	TGCAGCCAAATCTCAACTACC
ccr8 lower	NM_005201		AAACCTTTCACACCCACACCTT
ccr9 upper	NM_031200	151	AGCCTTGGCCCTGTTGA
ccr9 lower	NM_031200		TGCCCATATCTGCTCACTGTA
ccr10 upper	NM_016602	118	GCCCCGCCCTTCCTGCTCA

ccr10 lower	NM_016602		CCACCTACTCCCCCTTCCCACGAC
ccr11 upper	NM_016557	90	CTCTGCCTTTGCTTGGATACATA
ccr11 lower	NM_016557		CACGGCGTCTGAGATTTGAGTT
cxcr1 upper	NM_000634	177	CCGTGCTTGTCCCTGTGG
cxcr1 lower	NM_000634		CTGTGCCCTAAGAGACTGTC
cxcr2 upper	NM_001557	146	AGTTTATGATTCCACCTACA
cxcr2 lower	NM_001557		TTCAACATCCTAACATAAA
cxcr3 upper	NM_001504	140	GTGGCCGAGAAAGCAGGGTAGACG
cxcr3 lower	NM_001504		CAGGGCGCAAGAGCAGCATCCACAT
cxcr4 upper	NM_003467	141	GATCCCTGCCCTCCCTGCTGACTAT
cxcr4 lower	NM_003467		AGGCCAACCATGATGTGCTGAAAC
cxcr5 upper	NM_032966	170	CCGGATCCTGGGTGGCTG
cxcr5 lower	NM_032966		CCGCCGGGTTTGATTGAT
cxcr6 upper	NM_006564	119	GACTTCCCTCCATCTCCA
cxcr6 lower	NM_006564		GGCCGTGCTCACCTCTCA
Cx3cr upper	NM_001337	169	TAGGCCAAGTTGTATCAGGTG
Cx3cr lower	NM_001337		GTGTGGCATTTGTTTGTGTA
xcr upper	NM_005283	181	AGCTCATCTTCGCCATCGTG
xcr lower	NM_005283		ACCGGGTTAAAGCAGCAGTG

340

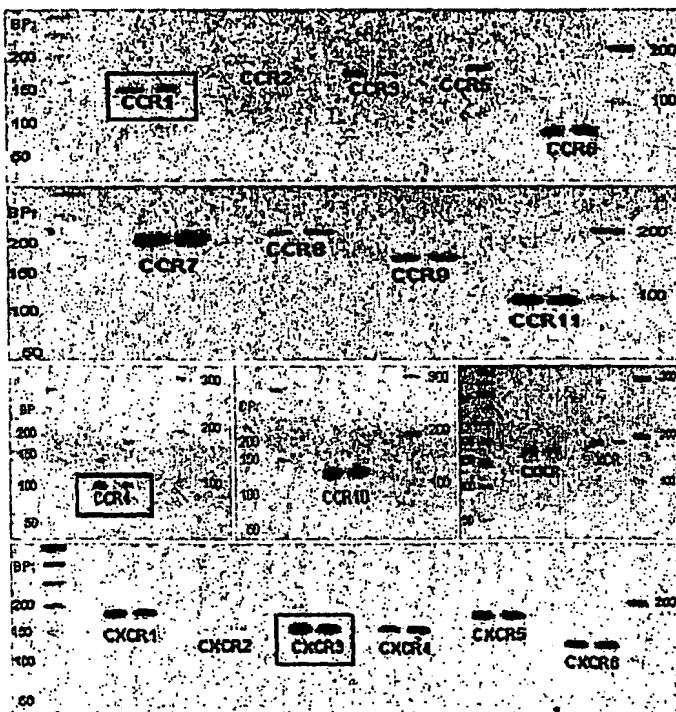


Abbildung 1: Nachweis der Expression der Chemokinrezeptoren in humanen mesenchymalen Stammzellen mittels RT-PCR.

345

Die für mehrere Patienten (n=3) durchgeführten Expressionsanalysen von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark im Hinblick auf die Präsenz von humanen Chemokinrezeptoren (Abbildung 1) ergaben eine hohe Expression der Rezeptoren 1-9, eine mittlere Expression der Rezeptoren 10-17 und eine schwache Expression der Rezeptoren 18-19 (Tabelle 3).

350

Tabelle 3: Expression und Expressionsniveau von Chemokinrezeptoren in humanen mesenchymalen Stammzellen

Nr.	Rezeptor	Liganden
1	CCR7	CCL19, CCL21
2	CCR10	CCL27, CCL28
3	CCR6	CCL20
4	CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11
5	CXCR6	CXCL16
6	CXCR5	CXCL13
7	CXCR1	CXCL5, CXCL6, CXCL8
8	CXCR4	CXCL12
9	CCR11	CCL2, CCL8, CCL13, CCL19, CCL21, CCL25
10	CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14a, CCL14b, CCL15, CCL16, CCL23
11	CCR9	CCL25
12	CX3CR	CX3CL1
13	XCR	XCL1, XCL2
14	CCR8	CCL1, CCL16
15	CCR4	CCL3, CCL5, CCL17, CCL22
16	CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14
17	CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL24, CCL26
18	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL7, CXCL8
19	CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13

355

Die differierenden Expressionshöhen legen Nahe, daß hierbei die Liganden der am höchsten exprimierten Rezeptoren diejenigen Chemokine sind, auf welche die mesenchymalen Stammzellen am Stärksten ansprechen und wandern. Mit abnehmendem Expressionsniveau sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß die Stammzellen auf das dem Chemokinrezeptor korrespondierende Chemokine chemotaktisch reagieren und wandern. Hiervon ausgehend ergibt sich, daß sich humane mesenchymale Stammzellen am Stärksten durch Stimulieren beginnend mit Chemokin-Nr. 1 abnehmend zu Chemokin-Nr. 41 der Tabelle 4 aktivieren und in situ rekrutieren lassen.

360

365

Tabelle 4: Chemokine zur in situ Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen

Nr.	Chemokin	Referenzsequenz
1	CCL19	NM 006274
2	CCL21	NM 002989
3	CCL27	NM 006664
4	CCL28	NM 148672
5	CCL20	NM 004591
6	CXCL9	NM 002416
7	CXCL10	NM 001565
8	CXCL11	NM 005409
9	CXCL16	NM 022059
10	CXCL13	NM 006419
11	CXCL5	NM 002994
12	CXCL6	NM 002993
13	CXCL8	NM 000584
14	CXCL12	NM 000609
15	CCL2	NM 002982
16	CCL8	NM 005623
17	CCL13	NM 005408
18	CCL25	NM 005624
19	CCL3	NM 002983
20	CCL4	NM 002984

Nr.	Chemokin	Referenzsequenz
21	CCL5	NM 002985
22	CCL7	NM 006273
23	CCL14	NM 004166
24	CCL15	NM 004167
25	CCL16	NM 004590
26	CCL23	NM 005064
27	CX3CL1	NM 002996
28	XCL1	NM 002995
29	XCL2	NM 003175
30	CCL1	NM 002981
31	CCL17	NM 002987
32	CCL22	NM 002990
33	CCL11	NM 002986
34	CCL24	NM 002991
35	CCL26	NM 006072
36	CXCL1	NM 001511
37	CXCL2	NM 002089
38	CXCL3	NM 002090
39	CXCL7	NM 002704

Ausführungsbeispiele:

370

Beispiel 1

Zur Behandlung einer ausgeprägt arthrotisch deformierten Gelenkoberfläche werden zunächst durch multiple feine Bohrungen (1-2 mm) kleine

375 Verbindungskanäle zwischen dem Knochenmarksraum und der Gelenkshöhle hergestellt. Darauf folgend wird ein wolleartiges Polymerkonstrukt (Polyglykolid) kombiniert mit Hyaluronsäure und chemotaktische wirkenden Chemokin (CCL19) über die Gelenkfläche mit Fibrin- oder Acrylkleber geklebt und angepasst.

380

Beispiel 2

Zur Behandlung der Gelenkfläche aus Beispiel 1 wird nach Herstellung der Öffnungen in den Markraum Fibinkleber mit gespeichertem Wachstumsfaktor (cartilage derived morphogenetic protein) und chemotaktischem Faktor (CXCL9)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.